



# Avaliação do efeito antioxidante da bebida de café solúvel cafeinado e descafeinado *In vitro* e *In vivo*

Ramon Alves de Oliveira Paula<sup>1\*</sup>; Bruno Cesar Correa Salles<sup>2</sup>; Fernanda Borges de Araújo Paula<sup>3</sup>; Maria Rita Rodrigues<sup>3</sup>; Stella Maris da Silveira Duarte<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Belo Horizonte, MG, Brasil.  
<sup>2</sup> Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Alfenas, MG, Brasil.  
<sup>3</sup> Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Alfenas, MG, Brasil.

## RESUMO

**Fitoquímicos com ação antioxidante presentes no café, apresentam diversos benefícios na saúde devido as suas propriedades funcionais. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando-se ensaios *in vitro* para se investigar a atividade sequestrante de radicais livres DPPH e testes *in vivo* para determinar a inibição da peroxidação lipídica. Os dados obtidos permitem sugerir que as bebidas de café solúveis cafeinado e descafeinado apresentaram uma forte atividade antioxidante e esta é dependente da concentração. A atividade antioxidante *in vitro* da bebida de café solúvel cafeinado apresentou-se maior do que a do café solúvel descafeinado. No entanto, o tratamento não inibiu a peroxidação lipídica do cérebro de ratos *in vivo*, em comparação com o controle. O tratamento com a ingestão das diferentes bebidas reduziu a concentração de ferro sérico. Os dados obtidos sugerem que as bebidas de café solúvel apresentam uma forte atividade antioxidante e esta é dependente da concentração.**

Palavras chave: Café cafeinado. Café descafeinado. Atividade antioxidante.

## INTRODUÇÃO

Evidências recentes têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças. Vários autores têm associado os efeitos benéficos desses alimentos conhecidos como funcionais à presença de substâncias antioxidantes, denominados de compostos bioativos. A importância do estudo de agentes antioxidantes está relacionada à frequente associação entre danos teciduais e liberação de radicais livres (Svilaas *et al.*, 2004).

Radicais livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados em seu orbital mais externo, o que os torna extremamente reativos (Halliwell, 2000). Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio e nitrogênio são denominados, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). No organismo encontram-se envolvidos com a produção de ATP, fagocitose, regulação do crescimento celular entre outros. A produção de radicais livres representa, portanto, um processo fisiológico. Porém, em determinadas condições, pode haver um desequilíbrio entre a capacidade da defesa antioxidante das células e a elevação na produção de ERO e ERN, levando ao estresse oxidativo e nitrosativo, durante o qual algumas destas espécies reativas de oxigênio, tais como radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical hidroxil (OH•) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), podem produzir danos, como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares (Barreiros *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2006).

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos. Eles protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo (Araújo, 2011; Zambonin *et al.*, 2012; Oleaga *et al.*, 2012). Estudos sugerem que antioxidantes bem conhecidos como  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C e  $\beta$ -caroteno pouco contribuem com o total de antioxidantes na dieta sendo a principal contribuição é oferecida por antioxidantes

*Autor correspondente:* Ramon Alves de Oliveira Paula, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: alvesfarmacia@yahoo.com.br

como ácidos fenólicos, flavonóides e ligninas (Prior & Cao, 2000; Paganaga *et al.*, 1999).

O café é uma bebida muito popular no mundo e uma importante fonte de compostos fenólicos da dieta humana (Lee *et al.*, 2012; Lafay *et al.*, 2006). No entanto, sabe-se que o conteúdo de compostos bioativos antioxidantes do café pode variar de acordo com o tipo de processamento, tais como a descafeinização que é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação (Farah *et al.*, 2006). A maioria dos métodos de descafeinização existentes utiliza solventes para a extração da cafeína, como o diclorometano, acetato de etila, fluido supercrítico de dióxido de carbono, entre outros (Inmetro, 2012; Lima *et al.*, 2010). Durante a extração da cafeína, ocorre perda de outros componentes, como os ácidos clorogênicos incluindo o ácido 5-ACQ (Toci *et al.*, 2006; Abrahão *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado a atividade antioxidante da bebida de café cafeinado utilizando diferentes métodos sendo a maioria testes *in vitro* (Rodrigues, 2012; Morais *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010). Variações no conteúdo de cafeína e outros componentes, no volume da bebida ingerida, no modo do preparo da bebida, e no processamento industrial, são frequentemente observadas (Santos *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Muitos estudos atribuem a atividade antioxidante da bebida ao conteúdo de ácido clorogênico (Duarte *et al.*, 2005; Shahidi & Chandrasekara, 2010). Porém, grande parte dele é destruída com a torração embora outros compostos com atividade antioxidante sejam formados como os produtos da reação de Maillard (Rodarte *et al.*, 2009; López-Galilea *et al.*, 2008; Vignoli *et al.*, 2011). Outros estudos ainda têm correlacionado as propriedades antioxidantes da bebida de café ao conteúdo de cafeína (Morais *et al.*, 2009; Oleaga *et al.*, 2012).

Em estudo inédito, Rodrigues *et al.*, (2013), avaliaram a ação de antioxidantes sobre as espécies reativas produzidas pelo organismo por meio de um perfil qualitativo e quantitativo referente a cada composto bioativo presente no café. Os resultados encontrados mostraram que as bebidas de café são potentes desativadoras *in vitro* de todas as ERO e ERN. Revelando desta forma, que o consumo habitual da bebida de café pode reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas além de retardar o processo de envelhecimento.

Dentre os componentes do café, a cafeína, sempre recebeu maior atenção, devido as suas conhecidas propriedades fisiológicas e farmacológicas, principalmente em relação às propriedades estimulantes do sistema nervoso simpático (Ali *et al.*, 2012; Sin *et al.*, 2009), nem sempre desejáveis o que leva alguns consumidores preferirem a bebida obtida com café descafeinado.

Estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos podem provocar efeitos indesejáveis nos organismos humano e animal (Morgano *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2010), indicando a necessidade de pesquisas sobre a utilização de antioxidantes naturais. Por outro lado, inúmeros antioxidantes naturais têm sido

consumidos sem o devido conhecimento de seus efeitos no organismo vivo (Rodrigues *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003).

Assim, o presente estudo objetivou, analisar a atividade antioxidante da bebida de café solúvel cafeinado e descafeinado, preparado como consumido pela população brasileira, utilizando testes *in vitro* e *in vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras de café

As amostras do café solúvel cafeinado e descafeinado (*Coffea arabica* L.) foram obtidas de um mesmo fabricante no comércio local, na cidade de Alfenas, sul de Minas Gerais.

### Preparo da bebida

A bebida do café solúvel foi preparada de acordo com as instruções da embalagem. Foram adicionados aproximadamente 1,0 g de café em pó e em seguida, foram vertidos 50 mL de água destilada, a 90°C sobre o pó. Todos os experimentos foram realizados com bebida preparada no momento de uso.

### Determinação do teor de polifenóis

O teor de polifenóis das bebidas de café solúvel cafeinado e descafeinado foi quantificado pelo método de Folin-Denis, descrito pela Association of Official Agriculture Chemists-AOAC (1990).

### Perfil cromatográfico da bebida de café

O perfil cromatográfico da bebida de café foi obtido utilizando-se cromatoplacas de sílica-gel GF<sub>254</sub> (Merck). Um volume de 0,05 mL de cada amostra foi aplicado e utilizou-se o solvente clorofórmio: acetona (4:1) como fase móvel. Foram utilizados dois reveladores: solução etanólica de DPPH (0,04% p/v) e Dragendorff iodado (Clarke, 1969). Foram utilizados 0,05 mL de ácido ascórbico a 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> como padrão.

### Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

#### Atividade sequestrante de radicais livres DPPH

A atividade sequestrante de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) da bebida de café foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hatano e colaboradores (1988), com modificações. Cada amostra foi diluída em etanol a 25, 50, 100, 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Em 4 mL da amostra adicionou-se 1 mL de DPPH. (0,5 mmol.L<sup>-1</sup>) igualmente diluído em etanol. A mistura foi acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 min, fez-se a leitura em espectrofotômetro, UV/Visível Shimadzu a 517 nm. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade sequestrante (%ASRL) foi expressa em porcentagem por comparação ao controle, ácido ascórbico nas mesmas diluições das amostras de café, conforme a equação:

$$\% \text{ ASRL} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

Onde, Ac: absorvância controle; At: absorvância teste (amostra).

#### **Avaliação da atividade antioxidante *in vivo***

##### **Delineamento e grupos experimentais**

Foram utilizados 40 ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus)*, com oito semanas de idade, pesando  $270 \pm 20$  gramas, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Durante o período experimental, animais foram mantidos em caixas de polietileno individuais à temperatura de 23°C, com período claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial ad libitum.

Os animais foram divididos em 5 grupos de 8 animais: controle – C (receberam água destilada), tratado cafeinado – TC (receberam 3,6 mL/Kg/dia da bebida de café solúvel cafeinado 2% p/v), tratado descafeinado – TD (receberam 3,6 mL/Kg/dia da bebida de café solúvel descafeinado 2% p/v), tratado cafeinado dose dobrada – TC2 (receberam 7,2 mL/Kg/dia da bebida de café solúvel cafeinado 2% p/v), tratado descafeinado dose dobrada – TD2 (receberam 7,2 mL/Kg/dia da bebida de café solúvel descafeinado 2% p/v).

A bebida de café recém-preparada foi administrada aos animais por gavagem oral, uma vez ao dia, por 15 dias, assim como a água do controle. A dose utilizada corresponde ao consumo humano diário de 5 xícaras de 50 mL da bebida de café (3,6 mL/Kg/dia) e de 10 xícaras de 50 mL para o grupo que recebeu dose dobrada (7,2 mL/Kg/dia).

##### **Determinação da peroxidação lipídica**

Com o intuito de verificar se as bebidas de café são capazes de reduzir o estresse oxidativo, foi analisada a peroxidação de lipídeos. O cérebro dos animais de todos os grupos experimentais foi removido, pesado e homogeneizado, em banho de gelo, com auxílio de homogeneizador de tecidos (Tecnal - modelo TE-100), após adição de um volume de PBS 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 equivalente a quatro vezes o peso fresco do tecido. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 1000 xg, por 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e utilizado nos ensaios para análise da peroxidação lipídica.

Aperoxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Winterbourn e colaboradores (1985). Amostras de 500 µL, de homogeneizado de cérebro de ratos dos grupos controle e tratado, foram adicionados a 500 µL de ácido clorídrico a 25% (v/v) e 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v) em hidróxido de sódio a 0,1 M e 45 µL de BHT a 2% (p/v em etanol). A mistura foi aquecida em água fervente por 10 min, resfriada em banho de gelo por 10 min e centrifugada a 900 xg, por 15

min. As TBARS foram determinadas utilizando-se a fração correspondente ao butanol em Abs535 e a concentração foi obtida por meio da curva-padrão utilizando-se tetraetoxipropano (MDA) como padrão (Brown & Kelly, 1996). Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/g de proteína.

##### **Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Uma alíquota contendo 10 µL de homogeneizado de fígado foi adicionada a 790 µL de água destilada e 200 µL de comassie Brillante Blue G-250 em etanol 95% m/v. Em seguida foi determinada a densidade ótica a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração proteica (µg/10 µL) foi calculada por inserção numa curva de calibração previamente feita com BSA (5-25µg/mL).

##### **Determinação dos Parâmetros Bioquímicos**

Para determinação dos parâmetros ferro sérico e índice de saturação da transferrina (IST) o sangue de ratos foi coletado por punção cardíaca, antes da eutanásia, após anestesia com éter. Os parâmetros foram determinados por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se soro (Burtis & Ashwood, 1999).

##### **Análise estatística**

Todas as medidas foram realizadas em triplicatas, sendo os dados obtidos analisados com o programa Statistica 6.0 e comparados por análise de variância pelo teste one-way ANOVA, seguidos pelo teste de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

##### **Determinação do teor de polifenóis**

A concentração de compostos fenólicos da bebida de café cafeinado e descafeinado foi respectivamente  $21,56 \pm 1,19$  g eq ac. tânico/100g e  $21,11 \pm 1,74$  g eq ac. tânico/100g demonstrando que o processo de descafeinização utilizado na obtenção do café não causou redução significativa no conteúdo de polifenóis da amostra.

##### **Perfil cromatográfico da bebida de café**

O perfil cromatográfico, obtido pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrou que o café solúvel cafeinado e descafeinado apresentaram um hRf de 21,4 e 10,0 respectivamente com um sistema solvente clorofórmio: acetona (4:1) e na revelação com DPPH uma mancha amarela nas amostras de café solúvel cafeinado e descafeinado mostrou uma atividade sequestrante de radicais livres semelhante ao ácido ascórbico utilizado como padrão. Nas amostras de café descafeinado nenhuma mancha foi observada.

##### **Atividade sequestrante de radicais livres**

Os resultados obtidos para a atividade sequestrante

Tabela 1. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres (DPPH) *in vitro* na bebida de café solúvel cafeinado (CSC) e descafeinado (CSD) em quatro concentrações 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CSC (%) $\pm$ DP	CSD (%) $\pm$ DP
25	76,3 $\pm$ 1,16	40,6 $\pm$ 3,51
50	89,3 $\pm$ 0,58	61,0 $\pm$ 2,00
100	90,3 $\pm$ 0,58	73,3 $\pm$ 1,53
200	90,6 $\pm$ 2,08	87,0 $\pm$ 1,00

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos determinados no soro de rato controle (C) e tratado por 15 dias com 3,6 mL.kg<sup>-1</sup> da bebida de café solúvel cafeinado 2% (TC), café descafeinado 2% (TD), e com 7,2 mL.kg<sup>-1</sup> da bebida de café solúvel cafeinado (TC2) e descafeinado (TD2) 2%.

Parâmetros Bioquímicos	C (mg/dL $\pm$ DP)	TC (mg/dL $\pm$ DP)	TD (mg/dL $\pm$ DP)	TC2 (mg/dL $\pm$ DP)	TD2 (mg/dL $\pm$ DP)
Ferro Sérico	188,62 $\pm$ 56,6a	136,5 $\pm$ 34,3b	130,75 $\pm$ 14,26b	112,6 $\pm$ 28,26b	104,4 $\pm$ 12,52b
IST (%)	41,5 $\pm$ 12,07a	30,8 $\pm$ 7,95a	30,5 $\pm$ 30,71a	26,2 $\pm$ 6,90b	25,8 $\pm$ 3,42b

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

de radical DPPH das bebidas de solúvel cafeinado e descafeinado estão expressos na Tabela 1. A comparação do poder sequestrante entre o café solúvel cafeinado e descafeinado mostrou diferenças significativas ( $p < 0,005$ ). O café solúvel cafeinado apresentou uma maior atividade sequestrante de radicais livres que o café solúvel descafeinado e esta atividade é dependente da concentração, pois a maior atividade foi obtida com bebidas de café na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Mesmo em baixa concentração o café apresentou uma forte atividade sequestrante.

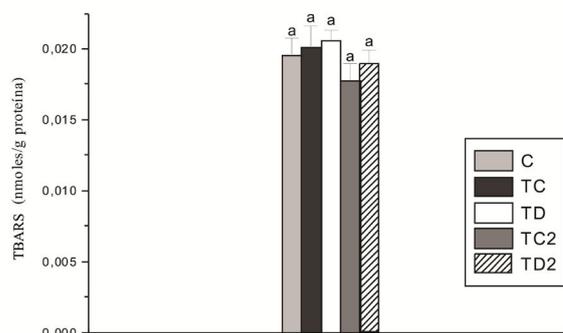
### Inibição da Peroxidação Lipídica

No presente trabalho verificou-se que a ingestão moderada da bebida de café solúvel por 15 dias não induziu inibição significativa da peroxidação lipídica nos diferentes grupos analisados quando comparados ao controle. No entanto, pode-se observar uma tendência à redução da peroxidação lipídica quando doses maiores de café foram utilizadas (Figura 1).

### Parâmetros Bioquímicos

O efeito da bebida de café cafeinado e descafeinado sobre a concentração de ferro sérico e do índice de saturação da transferrina (IST) seguem apresentados na Tabela 2.

Figura 1



## DISCUSSÃO

Sabe-se que fatores como a genética, sistema de cultivo, tipo de processamento e torrefação podem determinar uma variação da composição química e, portanto, influenciar nas propriedades antioxidantes da bebida de café (Lima *et al.*, 2010).

No processo de produção do café solúvel os grãos torrados são moídos e submetidos à extração sob pressão em altas temperaturas (180°C) o que promove, na verdade, um enriquecimento de sólidos solúveis em relação à matéria-prima. O extrato é então desidratado em vaporizadores ou liofilizadores originando o café solúvel em pó granulado. Entretanto, a composição desse material solúvel dependerá, além das condições do processamento, das espécies e variedades utilizadas nos “blends”. Por exemplo, o café Robusta apresenta maiores teores de cafeína e ácidos clorogênicos e menores de trigonelina do que o café Arábica. A participação de cada uma dessas espécies utilizadas pelo fabricante e as condições do processamento industrial serão, portanto, determinantes da composição final do café obtido (Trugo & Nogueira, 2003).

Os polifenóis do café compreendem um grupo heterogêneo de substâncias, umas com estruturas químicas relativamente simples e outras complexas, como taninos e ligninas, contribuindo de maneira significativa para o sabor e aroma da bebida. Dos polifenóis os chamados ácidos clorogênicos são os mais importantes antioxidantes e os que se apresentam em maior quantidade na bebida (Duarte *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que o processo de descafeinização induz a perda de ácido 5-cafeoilquímico na bebida devido à sua complexação com a cafeína (Toci *et al.*, 2006). A discrepância entre os resultados observados neste estudo e no presente trabalho poderia ser atribuída às diferenças na composição inicial de polifenóis no “blend” utilizado para a obtenção das amostras de cafés utilizadas.

Em relação aos resultados encontrados na análise cromatográfica, a revelação com Dragendorff iodado, permitiu detectar a presença de alcalóides, principalmente,

cafeína visualizada pelas manchas evidentes na parte inferior da cromatoplaça nas amostras de café cafeinado. Nas amostras de café descafeinado nenhuma mancha foi observada, o que é justificado pela baixa concentração de cafeína nesta bebida, uma vez que a legislação brasileira define um patamar de no máximo 0,1% de cafeína em café descafeinado (Toci *et al.*, 2006).

#### Atividade sequestrante de radicais livres

Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétrons livres, perdem esta cor quando um radical hidrogênio, doado por uma molécula antioxidante, entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se assim, a absorvância independente de alguma atividade enzimática. Dados da literatura sugerem que os compostos fenólicos da bebida de café contribuem com a atividade antioxidante, porém, no presente estudo não foi observada diferença no conteúdo de polifenóis nas bebidas de café utilizadas. Sendo assim a maior atividade antioxidante do café cafeinado poderia ser atribuída à formação de outras substâncias antioxidantes durante a torrefação, provavelmente compostos da reação de Maillard e melanoidinas (Cid *et al.*, 2004; Daglia *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que a cafeína apresenta atividade antioxidante (Dórea & Costa, 2005; Lima *et al.*, 2010). No entanto, ainda existem controvérsias em relação a esta atividade. Jardim (2005), avaliando o efeito da ingestão de cafeína na atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídeos e na produção de radicais livres em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos adultos, demonstrou que a cafeína administrada cronicamente, causou um aumento na peroxidação de lipídios de membranas e uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase, quando comparadas ao controle. Os dados observados no presente trabalho sugerem que a cafeína poderia estar contribuindo para maior atividade antioxidante do café cafeinado.

#### Inibição da Peroxidação Lipídica

O cérebro possui grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, baixos níveis de glutathione reduzida (GSH) (Oboh & Henle, 2009; Liu *et al.*, 2000) e também baixos níveis de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Leonard & Maes, 2012), que o torna suscetível a peroxidação lipídica.

Os produtos de peroxidação lipídica como malonaldeído (MDA) são altamente reativos, podendo reagir com proteínas, lipídeos e DNA (Medeiros *et al.*, 2002; Souza, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007). Vários dados da literatura têm demonstrado o envolvimento da peroxidação lipídica na fisiopatologia de doenças neurológicas. Assim, o consumo de antioxidantes pode contribuir para a diminuição da peroxidação lipídica, diminuindo a instalação de lesões celulares e teciduais (Oboh & Henle, 2009; Panagiotakos *et al.*, 2003).

Apesar da atividade antioxidante *in vitro* demonstrada neste trabalho pelas bebidas de café solúvel cafeinado e

descafeinado, a administração destas bebidas não preveniu a peroxidação lipídica em cérebro de ratos, indicando que estudos da atividade antioxidante *in vitro*, são, às vezes, de natureza simplificada para a verificação de sua ação e a extrapolação para o organismo vivo, com toda a sua complexidade e com numerosos processos ocorrendo simultaneamente. Além disso, deve-se considerar a absorção, biotransformação, distribuição tissular e eliminação dos diferentes compostos presentes no café. Resultados semelhantes são encontrados na literatura (Moutaery *et al.*, 2003; Jardim, 2005).

#### Parâmetros Bioquímicos

A capacidade de alguns fenólicos em interagir com íons metálicos (Barriuello, 2005; Ducat, 2009), provavelmente exerceu uma influência significativa na redução da concentração de ferro sérico e do IST observada neste estudo. O processo de descafeinização não influenciou significativamente neste resultado talvez por não apresentarem diferenças na concentração de polifenóis entre as bebidas analisadas. O estudo de Layrisse e colaboradores (2000), demonstrou que a ingestão da bebida de café expresso resultou em uma redução significativa de 50% a absorção de ferro comparado com um jejum sem a ingestão de café. A saturação da transferrina não é quantificada diretamente, mas obtida como uma razão entre o ferro sérico e a dosagem da capacidade total de ligação do ferro. A porcentagem de saturação é baixa na deficiência de ferro (Camargo, 2013).

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam estas lesões. O papel dos metais, principalmente o ferro, na formação das espécies reativas de oxigênio é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Mauricio, 2006; Barreiros & David, 2006). A quelatação de íons ferro pelos antioxidantes pode inibir a formação do radical hidroxila pela reação de Fenton, reduzindo o efeito danoso destes radicais pela remoção de seus elétrons livres para formar água e radical antioxidante (Ferreira, 2005; Mattos, 2009). Compostos fenólicos agem como antioxidantes. Um dos mecanismos propostos é a capacidade quelante de íons metálicos pró-oxidantes, como o ferro.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que todas as bebidas de café solúvel estudadas apresentaram considerável atividade antioxidante dependente da concentração, podendo prevenir ou reduzir a ocorrência de patologias associadas ao estresse oxidativo. Apesar de ser umas das maiores fontes de antioxidante dietético, seu consumo deve ser moderado, já que embora o efeito antioxidante seja almejado, este pode influenciar de maneira negativa na utilização do ferro proveniente da dieta.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

## ABSTRACT

*Antioxidant effect evaluation of caffeinated and decaffeinated coffee brew In vitro and In vivo*

**Phytochemicals with antioxidant activity contained in coffee presents many health benefits due to their functional properties. This study aimed to determine the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of soluble caffeinated and decaffeinated coffee beverage. Soluble solid parameters and phenolic compounds, as well as, antioxidant activity were analyzed using *in vitro* essays to investigate free radical scavenging activity. *In vivo* essays were used to determine lipid peroxidation inhibition. The *in vitro* antioxidant activity of soluble caffeinated coffee was higher comparing to decaffeinated soluble coffee. However, comparing to the control, the treatment does not inhibit rat brain lipid peroxidation *in vivo*. It was also observed that the consumption of different beverages reduces the concentration of serum iron. The data obtained suggest that soluble coffee beverages present a strong antioxidant activity which depends on the concentration.**

Keywords: Caffeinated coffee. Decaffeinated coffee. Antioxidant activity.

## REFERÊNCIAS

- Abrahão AS, Pereira RGFA, Lima AR, Ferreira EB, Malta MR. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. *Pesq Agropec Bras*. 2008; 43(12): 1799-1804.
- Ali MM, Eisa M, Taha MI, Zakaria BA, Elbashir AA. Determination of caffeine in some Sudanese beverages by High Performance Liquid Chromatography. *Pakistan J Nutr*. 2012; 11(4): 336-42.
- Alves RC, Costa ASG, Jurez M, Casal S, Sineiro J; Nunes MJ, Oliveira B. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(23): 12221-229.
- Araújo CRR. Composição Química, Potencial Antioxidante e Hipolipidêmico da Farinha da Casca de Myrciaria cauliflora (Jabuticaba). [Dissertação]. Diamantina: Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2011.
- Association of Official Agricultural Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 12a ed. Washington; 1990.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécie reativas e a defesa do organismo. *Quím Nova*. 2006; 29(1): 113-23.
- Barriquello MF. Influência de íons metálicos na estrutura de substâncias húmicas detectados por espectroscopia. [Tese]. São Carlos: Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos; 2005.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72; 248-54.
- Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and other products. In: PUNCHARD NA. & Kelly FJ. (Ed.). *Free Radicals: a practical approach*. New York: IRL Press, 1996. P.119-31.
- Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3nd. USA: WB Saunders Co Philadelphia; 1999.
- Camargo RMS, Espinosa MM, Pereira SF, Schirmer J. Prevalência de anemia e deficiência de ferro: relação com índice de massa corporal em gestantes do Centro-Oeste do Brasil. *Medicina*. 2013; 46(2): 118-27.
- Cid C, Andueza S, Nicoli MC. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “Torrefacto” coffee. *Lebensm-Wiss U Technol*. 2004; 37(8): 893-97.
- Clarke EGC. *Isolation and Identification of Drugs*. ed. lit. London, Pharmaceutical Press, 1969.
- Daglia M, Racchi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G. *In vitro* and *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(6): 1700-04.
- Dórea JG, Da Costa THM. Is coffee a functional food? *Br J of Nutr*. 2005; 93(6): 773-82.
- Duarte SMS, Abreu CMP, Menezes HC, Paula FBA, Pereira RGFA, Gouvêia CMCP. Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009; 23(4): 703-08.
- Duarte SMS, Abreu CMP, Santos MH, Gouveia CMCP. Effect of processing and roasting of the antioxidant activity of coffee brews. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25(2): 387-93.
- Ducat G. Avaliação da correlação de íons metálicos e compostos fenólicos em plantas medicinais. [Dissertação]. Guarapuava: Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2009.
- Farah A, De Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. Chlorogenic acids and lactones in regular and decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(2): 374-81.
- Ferreira, EA. Avaliação do potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos de acetofenona. [Dissertação]. Florianópolis: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

- Halliwell B. The antioxidant paradox. *The Lancet*. 2000; 355(9210), 1179-80.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull*. 1988; 36(6): 2090-97.
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Programa de análise de produtos: Relatório sobre análise do teor de cafeína em produtos descafeinados. Rio de Janeiro; 2012.
- Jardim FMA. Efeito da ingestão crônica de cafeína na atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídeos e na produção de radicais livres em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos adultos. [Dissertação]. Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
- Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr*. 2006; 136(5): 1192-97.
- Layrisse M, Garcia-casal MN, Solano L. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. *Hum Nutr Metab*. 2000; 130(9): 2195-99.
- Lee KA, Chae J, Shim JH. Natural diterpenes from coffee, cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. *J Biomed Sci*. 2012; 19(1): 1-10.
- Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav R*. 2012; 36(2): 764-85.
- Lima AR, Pereira RGFA, Abrahão AS. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Quím Nova*. 2010; 33(1): 20-24.
- Lima FA, Sant'ana AEG, Ataíde TR, Omena CMB, Menezes MES, Vasconcelos SML. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. *Rev Nutr*. 2010; 23(6): 1063-73.
- Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW *et al*. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*. 2000; 89(1):21-8.
- López-Galilea I, De Peña MP, Cid C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *Eur Food Res and Technol*. 2008; 227(1): 141-49.
- Machado LMM, Costa THM, Silva EF, Dórea JG. Association of moderate coffee intake with self-reported diabetes among urban brazilians. *Int J Environ*. 2011; 8(8): 3216-31.
- Mattos TCG. Mecanismos de ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. [Dissertação]. Brasília: Instituto de Química, Universidade de Brasília; 2009.
- Mauricio, AQ. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. [Dissertação]. Brasília: Instituto de Química, Universidade de Brasília; 2006.
- Medeiros MHG, Loureiro APM, Di Mascio P. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím Nova*. 2002; 25(5): 777-93.
- Morais SAL, Aquino FJT, Nascimento EA, Oliveira GS; Chang R, Santos NC, Rosa GM. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008; 28(Supl.): 198-207.
- Morais SAL, Aquino FJT, Nascimento PMN, Nascimento EA, Chang R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. *Quím Nova*. 2009; 32(2): 327-31.
- Morgano MA, Pauluci LF, Mantovani DMB, Mory EEM. Determinação de minerais em café cru. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22(1): 19-23.
- Moutaery KA, Deed AS, Khan HA, Tariq M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *J Neurosurg*. 2003; 53(3): 704-12.
- Oboh G, Henle T. Antioxidant and inhibitory effects of aqueous extracts of *Salvia officinalis* leaves on pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain and liver *in vitro*. *J Med Food*. 2009; 12(1): 77-84.
- Oleaga C, Ciudad CJ, Noé V, Izquierdo-Pulido, M. Coffee polyphenols change the expression of STAT5B and ATF-2 modifying cyclin D1 levels in cancer cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012: 1-17.
- Paganaga G, Miller N, Rice-Evans, CA. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities: what does a serving constitute? *Free Radic Res*. 1999; 30(2): 153-62.
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Kokkinos P, Toutouzias P, Stefanadis C. The J-Shaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: The CARDIO 2000 case-control study. *J Nutr*. 2003; 133(10): 3228-32.
- Prior RL, Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Hort Sci*. 2000; 35(4): 588-92.
- Rodarte MP, Abrahão AS, Pereira RGFA, Malta MR. Compostos não voláteis em cafés da região Sul de Minas submetidos a diferentes pontos de torração. *Ciênc Agrotec*. 2009; 33(5): 1366-71.

- Rodrigues IR. Composição química do café do Alto Vale do Jequitinhonha e comparação dos efeitos subcrônicos da cafeína e do café em ratos. [Dissertação]. Diamantina: Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2012.
- Rodrigues NP, Benassi MT, Bragagnolo N. Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. *Food Res Int.* 2013; 1-8.
- Rodrigues HG, Diniz YS, Faine LA, Almeida JÁ, Fernandes AAH, Novelli EL B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. *Rev Nutr.* 2003; 16(3): 315-20.
- Rojano BA, Naranjo M, Vélez LT. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Rev Cubana Plant Med.* 2011; 16(2): 164-73.
- Santos MA, Chalfoun SM, Pimenta CJ. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico-química e química do café (*Coffea arabica* L). *Ciênc Agrotec.* 2009; 33(1): 213-18.
- Shahidi F, Chandrasekara A. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochem Rev.* 2010; 9(1): 147-70.
- Sin CWM, Ho JSC, Chung JWY. Systematic review on the effectiveness of caffeine abstinence on the quality of sleep. *J Clin Nurs.* 2009; 18(1): 13-21.
- Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(4): 1077-80.
- Souza MAA. Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango. [Dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2006.
- Svilaas A, Sakhi AK, Andersen LF, Svilaas T, Strom EC, Jacobs Jr. DR, Ose L, Blomhoff R. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J Nutr.* 2004; 134(3): 562-67.
- Toci A, Farah A, Trugo LC. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. *Quím Nova.* 2006; 29(5): 965-71.
- Trugo LC, Nogueira M. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc Tecnol de Aliment.* 2003; 23(2): 296-99.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota, LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova.* 2007; 30(5): 1323-38.
- Vasconcelos SML, Silva MAM, Goulart MOF. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. *J Brazilian Soc Food Nutr.* 2006; 31(3): 95-118.
- Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 2011; 124(3): 863-68.
- Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B. Doxorubicin dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. *J Free Radic Biol Med.* 1985; 1(1): 43-49.
- Zambonin L, Caliceti C, Sega FVD, Fiorentini D, Hrelia S, Landi L, Prata C. Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 1-12.

Recebido em 19 de março de 2014

Aceito em 9 de junho de 2014